



21 Aktenzeichen: 198 24 280.8  
22 Anmeldetag: 29. 5. 98  
43 Offenlegungstag: 2. 12. 99

71 Anmelder:  
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

72 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

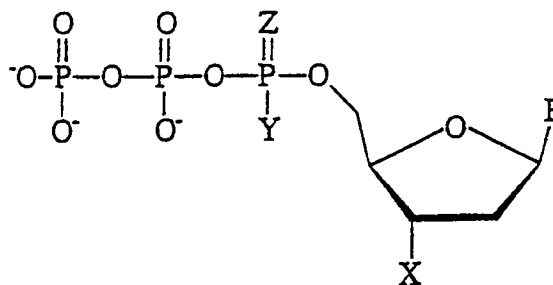
56 Entgegenhaltungen:  
WO 98 14 616 A1  
WO 96 27 681 A1  
Little D.P. et al., Detection of RET proto-oncogene Codon 634 mutations using mass spectrometry, J. Mol. Med. 75 (1997) 745-750;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Mutationsanalyse mittels Massenspektrometrie

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung des durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigten Genmaterials Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf das Auftreten von bekannten Mutationen mit Hilfe einer Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI). Die Erfindung betrifft die Verwendung eines besonderen Satzes modifizierter Nukleosidtriphosphate für das an sich bekannte Verfahren der beschränkten Primerverlängerung in einer kopierenden, enzymatischen Reaktion und gegebenenfalls die Verwendung ebenfalls modifizierter Primer, so daß die entstehenden DNA-Produkte selektiv, adduktfrei und so bevorzugt ionisiert werden, daß sie von anderen Beimengungen der Reaktionslösung leicht unterschieden werden können. Das Verfahren eignet sich besonders für den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Mutationen.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung des durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigten Genmaterials Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf das Auftreten von bekannten Mutationen mit Hilfe einer Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI). Die Erfindung betrifft die Verwendung eines besonderen Satzes modifizierter Nukleosidtriphosphate für das an sich bekannte Verfahren der beschränkten Primerverlängerung in einer kopierenden, enzymatischen Reaktion und gegebenenfalls die Verwendung ebenfalls modifizierter Primer, so daß die entstehenden DNA-Produkte selektiv, adduktfrei und so bevorzugt ionisiert werden, daß sie von anderen Beimengungen der Reaktionslösung leicht unterschieden werden können. Das Verfahren eignet sich besonders für den gleichzeitigen Nachweise mehrerer Mutationen.

#### Stand der Technik

Gegenstand dieser Erfindung ist eine Methode zum simultanen Nachweis von einer oder mehreren mutativen Veränderungen innerhalb einer bestimmten Sequenz von genomischer DNA eines Organismus. Bei diesen Sequenzveränderungen kann es sich um Basenaustausch ("Punktmutationen") handeln, um Einfügungen von Basen ("Insertionen"), um Fehlen von Basen ("Deletionen"), aber auch von chemischen Veränderung einer Base, beispielsweise durch eine Methylierung.

Um Mutationen eindeutig zu charakterisieren, muß eine DNA-Sequenz, in der eine Mutation vermutet wird, de novo sequenziert werden. Um anschließend eine identifizierte Mutation bei einem anderen Individuum zu finden, bietet sich als bestdefinierte Analyse eine erneute Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnitts an. Für die Praxis würde dies bedeuten, daß der Nachweis einer bekannten Mutation in einem Probanden die gleichen Kosten verursachen würde wie die ursprüngliche Charakterisierung. Für die Sequenzierung werden verschiedene Gelelektrophoresearten eingesetzt, die jedoch langsam, teuer und nicht voll automatisierbar sind.

Für die Auffindung von bekannten Mutationen wurden daher alternative Techniken entwickeln. So können für die Identifizierung vieler bekannter Mutationen entsprechende DNA-Sequenzen durch Oberflächenfixierung auf einem DNA-Chip zusammengefaßt werden. Deren Hybridisierung oder Nichthybridisierung mit aufgetragenen Genmaterial kann zur simultanen Identifikation einer Vielzahl von verschiedenen Mutationen verwendet werden. So sind Chips mit 64 000 fixierten Sequenzen bekannt geworden. Diese DNA-Chiptechnologie hat jedoch einige wesentliche Nachteile, allen voran den, daß die Herstellung der DNA-Chips recht kostspielig ist. Da die Bestimmung einer großen Vielzahl von Mutationen eines Individuums nicht immer erforderlich ist, handelt es sich nicht gerade um eine preisangepaßte Diagnostik für eine bestimmte, definierte Erkrankung.

Es besteht somit nach wie vor ein Bedarf an Verfahren zur schnellen Erkennung von Mutationen, wobei ein mäßiger Grad an Multiplexierbarkeit erwünscht, aber je nach Schnelligkeit des Einzelverfahrens nicht unbedingt notwendig wäre.

Massenspektrometrie mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) ist eine sehr leistungsfähige Art der Analyse von Biomolekülen. Die Ionen können massenspektrometrisch, beispielsweise in Flugzeitmassenspektrometern, auf ihre Masse hin analysiert werden. Da die Fluggeschwindigkeit der Ionen im Massenspektrometer etwa  $10^7$  mal schneller ist als die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle im Gel der Elektrophorese, ist das massenspektrometrische Verfahren außerordentlich viel schneller als das elektrophoretische Verfahren, selbst wenn die Spektrenmessung 10- bis 100-mal wiederholt wird, um zu guten Signalzu-Rausch-Verhältnissen zu kommen.

Das gesamte MALDI-Präparations- und Meßverfahren besteht darin, daß zunächst die Analytmoleküle auf einem festen Probenträger in eine feste, UV-absorbierende Matrix, meist eine organische Säure, eingebettet werden. Der Probenträger wird in die Ionenquelle eines Massenspektrometers eingeführt. Durch einen kurzen Laserpuls von etwa 3 Nanosekunden Länge wird die Matrix ins Vakuum verdampft; das Analytmolekül wird dabei unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit gleichzeitig entstehenden Matrixionen wird die Ionisation des Analytmoleküls erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden die Ionen in der Ionenquelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

Technische Neuerungen der Hardware haben die Methode der Flugzeitmassenspektrometrie mit MALDI-Ionisierung signifikant verbessert. Erwähnenswert ist die zeitverzögernd einsetzende Beschleunigung (Delayed Extraction), mit der eine verbesserte Auflösung der Signale an einer Stelle im Spektrum erreicht wird. Durch eine zusätzliche dynamische Veränderung der Beschleunigungsspannung kann man eine gute Auflösung in einem weitem Massenbereich erreichen (DE 196 38 577).

MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger. Für Nukleinsäuren ist die Ionisierung im MALDI-Prozeß etwa 100-mal geringer als für Peptide und nimmt mit zunehmender Masse überproportional ab. Der Grund dafür liegt darin, daß für die Ionisation von Peptiden und Proteinen lediglich ein einziges Proton eingefangen werden muß. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter.

Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden gibt es einige sehr leistungsfähige Matrices, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA sind zwar mittlerweile einige effektive Matrices gefunden worden, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied zu Proteinen nicht verringert.

Dieser Empfindlichkeitsunterschied kann vermindert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, daß sie einem Peptid ähnlicher wird. Wie in WO 96/27681 dargelegt, lassen beispielsweise sich Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln, und die chemisch kovalente Kopplung einer einzelnen positiv oder negativ geladenen chemischen Gruppe ("charge tag") an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit in den gleichen Bereich, wie er für Peptide gefunden wird.

Durch diese Modifikationen hat sich auch die Möglichkeit eröffnet, ähnliche Matrices zu benutzen, wie sie für die De-

sorption von Peptiden verwendet werden. Ein weiterer Vorteil des "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegenüber Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter DNA-Analyte stark erschweren.

Es ist jüngst ein neues Verfahren zur Mutationsdiagnostik bekannt geworden, das die MALDI-Massenspektrometrie benutzt (Little, D.P., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., Frilling, A., Li, Y., McIver, R.T. and Köster, H.; Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry. J. Mol. Med. 75, 745-750, 1997). Der Primer (eine DNA-Kette, die als Erkennungssequenz fungiert) wird dabei so synthetisiert, daß er sich in unmittelbarer Nähe einer bekannten Punktmutation an den Templatstrang anlagert ("hybridisiert"). Zwischen der Position dieser Punktmutation und dem 3'-Ende des Primers (an diesem Ende wird der Primer verlängert) darf die Sequenz des Templatstrangs aus maximal drei der vier Nukleobasen zusammengesetzt sein. An der Punktmutationsposition tritt eine weitere Base zum ersten Mal auf. Mit einer Polymerase und einem besonderen Satz von desoxy-Nukleotidtriphosphaten (die maximal drei komplementären, die bis zur Punktmutationsposition auftreten) und einem didesoxy-Nukleotidtriphosphat (mit der Base, die komplementär zu der potentiellen Punktmutation ist) wird der Primer kopierend verlängert. Das didesoxy-Nukleosidtriphosphat beendet ("terminiert") die Kettenverlängerung. Je nach An- oder Abwesenheit der Punktmutation wird die Polymerasereaktion auf der Punktmutationsposition terminiert oder sie terminiert erst bei der nächsten entsprechenden Base jenseits der potentiellen Mutationsstelle. Dieses Verfahren, das aber auch eine Fixierung der Primer an einer Oberfläche einschließt, ist von den Autoren als "PROBE" bezeichnet worden.

Da jedoch in dieser Arbeit unmodifizierte DNA zur Analyse eingesetzt wird, erscheint ein wesentlicher Nachteil dieser Methode, daß verhältnismäßig viel DNA-Material enzymatisch hergestellt werden muß, um in der anschließenden Analyse entsprechend detektierbare Signale zu erhalten. Dazu kommt, daß das abzutastende PCR Produkt an einer festen Phase immobilisiert werden muß, damit die Endanalyse nicht durch Primer und den Templatstrang sowie durch Salze und Detergenzien aus der Polymerasereaktion negativ beeinflusst wird.

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, auf der Basis des PROBE-Verfahrens ein verbessertes massenspektrometrisches Verfahren für die schnelle und kostengünstige Untersuchung von Genmaterial auf eine beschränkte Zahl vorbekannter Mutationen wie Basenaustausch ("Punktmutationen"), Einfügungen von Basen ("Insertionen"), Fehlen von Basen ("Deletionen"), aber auch chemische Veränderung einer Base, zu finden, wobei die DNA-Kettenprodukte für eine hohe Präzision der Massenbestimmung möglichst kurz, und für eine gute Unterscheidbarkeit von Restprodukten der PCR möglichst empfindlich sein sollen. Es wäre darüberhinaus günstig, wenn die Länge der DNA-Kettenprodukte in gewissem Umfang wählbar wäre, um einen gleichzeitigen Nachweis mehrerer Mutationen in einem einzigen Meßvorgang vornehmen zu können.

#### Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung besteht darin, beim PROBE-Verfahren der Primerverlängerung nicht mit den normalerweise für die PCR verwendeten Primern und Nukleosiden zu arbeiten, sondern mit modifizierten Primern und modifizierten Nukleosiden, die sich entweder von sich aus oder in Verbindung mit einer späteren chemischen Umformung günstig auf die Ionisierung im MALDI-Prozeß auswirken, indem sie dadurch, daß sie nur noch eine einzige positive oder negative Ladung tragen, die Empfindlichkeit erhöhen, die DNA gegen Fragmentierungen stabilisieren, die Adduktbildung vermeiden und eine selektive Ionisierung gegenüber den weniger empfindlich ionisierbaren Verunreinigungen erzeugen. Die Erfindung besteht des weiteren darin, den aus dem Primer bestehenden Teil des Produktes nach der Polymerasereaktion mindestens teilweise zu entfernen. Dadurch wird die Masse des Produkts um einen signifikanten Teil verringert und in einen Massenbereich bewegt, in welchem eine viel bessere Auflösung und Präzision der Massenbestimmung erreicht werden kann. In dem Massenbereich von 1500 Da bis 2500 Da kann nach dem gegenwärtigen Stand der Technik Isotopenauflösung erreicht werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht hauptsächlich insgesamt aus folgenden Schritten:

- 1) einer ersten PCR-Vervielfältigung einer DNA-Sequenz, die durch ihre selektierenden Primer die Mutation umfaßt, mit eventueller Nachreinigung der PCR-Produkte,
- 2) einer Zugabe eines besonderen Satzes von modifizierten Nukleosidtriphosphaten für eine kopierende, beschränkte Primerverlängerung der bereits vorhandenen oder ebenfalls hier neu zugegebener Primer, wobei
  - (a) der besondere Satz von Nukleosidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Kettenverlängerung durch die Kopierreaktion beim nächsten Auftreten einer durch die Zusammensetzung des Satzes bestimmten Base im zu kopierenden DNA-Gegenstrang endet,
  - (b) der besondere Satz von Nukleosidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Primerverlängerung bis zur Stelle der Mutation oder darüber hinaus läuft, so daß die Produktkette im Wildtyp ein anderes Molekulargewicht hat als im Mutanten, und
  - (c) die Modifizierung der Nukleosidtriphosphate entweder allein oder in Verbindung mit einer nachträglichen chemischen Behandlung (in Schritt 4) zu einer Stabilisierung der DNA-Kette im Ionisierungsprozeß, zu einer Adduktminderung der Ionen, zu einer Erhöhung der Ionisierungsausbeute und/oder zu einer Veränderung der Masse der DNA-Kette führt,
- 3) einer durch den Schritt 2 vorbereiteten, beschränkten Primerverlängerung mit Hilfe eines Enzyms, das den DNA-Gegenstrang komplementär kopiert,
- 4) gegebenenfalls einer weiteren chemischen oder enzymatischen Modifizierung der Produktketten, die zu einer weitgehenden Neutralisierung der DNA (mit nur einer gewünschten, vorgeformten Ladung) und zu einer mindestens teilweisen Entfernung der Primer führt, und
- 5) einer massenspektrometrischen Bestimmung der Masse der modifizierten DNA-Produktketten und Zuordnung

der detektierten Massen zu Wildtyp oder bekannter Mutante.

Es wird damit das Ziel der Erfindung erreicht, die DNA-Kettenprodukte, die im Molekulargewicht die Information über die untersuchte Mutation tragen, weitgehend zu neutralisieren und mit erwünscht ladungstragenden chemischen Gruppen zu versehen, um sie im MALDI-Prozeß bevorzugt mit hoher Empfindlichkeit und selektiv vor anderen Bestandteilen der PCR-Reaktionslösung ionisieren zu können. Es wird weiterhin das Ziel der Erfindung erreicht, die Kettenprodukte so kurz wie möglich zu machen, indem die Primer, die keine Information über die Mutation liefern, ganz oder teilweise aus den Kettenprodukten entfernt werden. Dadurch wird das Molekulargewicht der DNA-Kettenprodukte klein und die Präzision der Massenbestimmung steigt

#### Beschreibung der Figuren

**Fig. 1** gibt ein MALDI-Massenspektrum bei Vorliegen des Wildtyps (homozygot) wieder. Die Masse des Produkts des Wildtyps ist 2594 Da. Als Matrix wurde ein Dünnschichtpräparation auf  $\alpha$ -CN-4-Hydroxy-Zimtsäuremethylester ( $\alpha$ -CNME) verwendet.

**Fig. 2** gibt das MALDI-Massenspektrum bei Vorliegen der Mutante (homozygot) wieder. Die Masse des Produkts der Mutante ist 3924 Da. Als Matrix wurde ein Dünnschichtpräparation auf  $\alpha$ -CNME verwendet.

**Fig. 3** zeigt ein MALDI-Massenspektrum bei Vorliegen des Wildtyps und der Mutante (heterozygot). Die Masse des Produkts des Wildtyps ist hier 2593 Da und die der Mutante ist 3916 Da. Die Produkte wurden in einer Kopierreaktion mit 2 unterschiedlichen Templaten hergestellt und entsprechend simultan aufgereinigt. Als Matrix wurde ein Dünnschichtpräparation auf  $\alpha$ -CNME verwendet.

**Fig. 4** ist eine Darstellung einer multiplexierten Abtastung eines Systems mit 5 potentiellen Punktmutationen nach dem erfindungsgemäßen Prinzip. X = Position der Termination beim Wildtyp, N = Position der Termination bei einer vorhandenen Punktmutation. In einer Mischung aller 5 Wildtypen und Mutanten werden nach entsprechender Aufarbeitung 10 unterscheidbare Massen detektiert. Bei jedem Individuum wird für jedes System entweder die Wildtypmasse oder die Mutantenmasse gefunden. Es ergibt sich eine charakteristische Verteilung der Massen.

**Fig. 5** zeigt schematisch die Nukleotide, welche im vorgelegten Verfahren zum Einsatz kommen können:

X = H, OH, SH, CH<sub>3</sub>, Alkyl, F, Cl, Br, CT<sup>+</sup>, CT<sup>-</sup>. X ist die Funktionsgruppe, die festlegt, ob eine weitere Polymerisierbarkeit von dieser Position an möglich ist: X = OH ermöglicht die Bindung zum nächsten Nukleotid, während jede andere Funktionsgruppe diese unterbindet. Weiter besteht die Möglichkeit, durch diese Funktionsgruppe eine Massenverschiebung zu erreichen.

Y = H, OH, O<sup>-</sup>, SH, S<sup>-</sup>, SeH, Se<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>F, CHF<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, Alkyl, BH<sub>2</sub>. Y ist die Funktionsgruppe, die verantwortlich für die Ladungsneutralisierbarkeit des molekularbiologisch hergestellten Produkts ist, da die  $\alpha$ -Phosphatgruppe in der Polymerisation mittels einer DNA-Polymerase erhalten wird, während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen abgespalten werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, das für die Verbesserung der Empfindlichkeit in der massenspektrometrischen Analyse notwendige Charge-Tag an dieser Y-Position festzumachen (z. B. CT<sup>+</sup> oder CT<sup>-</sup>).

B = Adenin, Guanin, Cytosin, Thymidin, Uracil, Inosin, Purin, Pyrimidin, Pyrrol, Nitro-Pyrrol, Indol, Nitro-Indol, Deaza-Guanin, Deaza-Adenin, Fluor-Uracil, Brom-Uracil, Pyrazol, Imidazol und deren substituierte Derivate. Für B bieten sich viele Derivate der natürlichen Nukleobasen an. Wesentlich ist die spezifische Basenpaarung mit natürlichen Nukleobasen eines zu kopierenden Templatstrangs.

Z=S,O.

**Fig. 6** zeigt fünf Varianten von Primern. Primer können so geartet sein, daß sie ein Charge-Tag in das Produkt einführen. Dies tun die Primervarianten 1-3. Alternativ können die Primer so geartet sein, daß sie zum Produkt keine Ladung beisteuern, wie dies bei den Varianten 4 und 5 der Fall ist. In diesen Fällen muß ein solcher Primer mit einem Nukleotidsystem kombiniert werden, durch welches das Charge-Tag beigelegt wird.

#### Besonders günstige Ausführungsformen

Ein besonders bevorzugtes Verfahren sieht daher wie folgt aus: Für die erste PCR-Vervielfachung durch Schritt 1 sind die Primer naturgemäß so zu wählen, daß sich die zu untersuchenden, bekannten Punktmutationen, Insertionen und Deletionen innerhalb des erzeugten PCR-Produktes befinden.

Es ist günstig, die Restnukleoside der PCR-Amplifikation zwischen den Schritten 1 und 2 durch an sich bekannte Verfahren zu entfernen, z. B. durch ein "nucleotide removal Kit" der Firma QIAGEN. Alternativ können die Restnukleoside mit einer alkalischen Phosphatase zersetzt und die Lösung ohne weitere Aufreinigung weiterverarbeitet werden.

Schema 1 zeigt die Probenvorbereitung für den Wildtyp. An ein mittels PCR hergestelltes Templat wird ein Primer hybridisiert. Mit einem Substratgemisch von  $\alpha$ -S-dATP,  $\alpha$ -S-dTTP und ddCTP, einer DNA-Polymerase und entsprechenden Puffern wird das Templat kopiert. Die Kettenverlängerung findet bis zum ersten G auf dem Templatstrang statt und wird da durch das eingebaute ddCTP terminiert. Anschließend wird ein Teil des Produktes mit einer Phosphodiesterase wegverdaut. Die Phosphodiesterase wird durch die erste thio-Brücke gestoppt, so daß ein Fragment entsteht, das lediglich die neu hergestellte DNA enthält. Durch anschließende Methylierung (zum Beispiel durch Methyljod) wird das Produkt weitgehend neutraliert. Durch den Einsatz eines unmodifizierten Phosphat-ddCTPs, welches sich nicht alkylieren läßt, wird die einfach negative Ladung des Produkts und damit eine leichte Ionisierung zum negativ geladenen Ion gewährleistet.

Templat des Wildtyps:

TpGpCpApTpGpApCpTpTpGpApGpTpCpGpTpTpApApTpGpTpApGpTpCpCpGpCpGpT  
GpTpApCpTpGpApApCpTpCpApGpC  
Primer

Kettenverlängerung mit  $\alpha$ -S-dATP,  $\alpha$ -S-dTTP, ddCTP ergibt:

TpGpCpApTpGpApCpTpTpGpApGpTpCpGpTpTpApApTpGpTpApGpTpCpCpGpCpGpT  
GpTpApCpTpGpApApCpTpCpApGpCsAsAsTsTsApC

Verdau ergibt: CsAsAsTsTsApC

Alkylierung ergibt: CaAaAaTaTaApC Masse: 2212 u

p = Phosphat (nicht alkylierbar); s = Phosphorthioat (alkylierbar); a = alkyliert

Schema 2 zeigt die Wirkung der gleichen Probenvorbereitung für die Mutante, wobei das Templat eine Punktmutation von G nach A trägt. Die Kopierreaktion überläuft die Position der Termination beim Wildtyp und stoppt erst beim nächsten G. Dadurch ist die Masse des Produkts wesentlich größer.

Templat der Mutante:

TpGpCpApTpGpApCpTpTpGpApGpTpCpGpTpTpApApTpApTpApGpTpCpCpGpCpGpT  
GpTpApCpTpGpApApCpTpCpApGpC  
Primer

Kettenverlängerung mit  $\alpha$ -S-dATP,  $\alpha$ -S-dTTP, ddCTP ergibt:

TpGpCpApTpGpApCpTpTpGpApGpTpCpGpTpTpApApTpApTpApGpTpCpCpGpCpGpT  
GpTpApCpTpGpApApCpTpCpApGpCsAsAsTsTsAsTsAsTpC

Verdau ergibt: CsAsAsTsTsAsTsAsTpC

Alkylierung ergibt: CaAaAaTaTaAaTaAaTpC Masse: 3223 u (statt 2212 u)

Im Schritt 2 wird ein reduzierter Satz von modifizierten desoxy-Nukleobausteinen (z. B.  $\alpha$ -S-Nukleotide oder  $\alpha$ -Me-Nukleotide) zugegeben, in dem dasjenige Nukleosid fehlt, bei dem die Kettenverlängerung anhalten soll. Dieses Ende muß so gewählt werden, daß das Molekulargewicht der Produktkette über die Art der Mutation Auskunft gibt. Ergänzend kann ein terminierender didesoxy-Nukleobaustein zugegeben werden, der nicht als desoxy-Nukleobaustein vorhanden ist. Dadurch wird erreicht, daß sich in Schritt 3 spezifische Kettenabbruchprodukte bilden, wie in den obigen Schemata 1 und 2 gezeigt.

Erfindungsgemäß kommen hier modifizierte Nukleotide zum Einsatz. So kann die Verwendung von neutralisierten Nukleosiden, wie etwa  $\alpha$ -Me-Nukleotiden, durch die Polymerasereaktion bereits ein ladungsneutrales DNA-Rückgrat ergeben.  $\alpha$ -S-Nukleotide lassen sich nach ihrem Einbau in die DNA-Kette durch die Polymerisation leicht neutralisieren, beispielsweise durch Alkylierung, insbesondere Methylierung.

Außerdem werden in Schritt 2 neue Primer zugegeben, die genügend dicht an den Mutationsstellen anlagern können, so daß ein Kettenabbruch Auskunft über die Mutation gibt, wie aus dem PROBE-Verfahren bekannt. Es ist zweckmäßig, daß die Primer bereits die "charge tags" für ein positives Charge-Tagging tragen. Das Charge-Tag wird vorzugsweise nahe am 3'-Ende des Primers angebracht und die Rückgratbrücken werden zwischen dem 3'-Ende und dem Charge-Tag so gewählt, daß sie einerseits ladungsneutralisiert werden können oder bereits selbst ladungsneutral sind und andererseits der späteren Beseitigung eines Teils des Primers widerstehen können.

An je einen Strang der in Schritt 1 vervielfältigten PCR-Produkte werden nun in Schritt 3 die neu zugegebenen Primer angelagert und anschließend enzymatisch kopierend verlängert, wobei die Primer im Gegensatz zu der oben erwähnten Arbeit von Little et al. nicht an einer festen Oberfläche immobilisiert zu sein brauchen.

Im Schritt 4 werden dann die DNA-Kettenprodukte durch selektive Entfernung der aus dem Primer stammenden Sequenzen verkürzt; hier findet aber auch die chemische Aufbereitung statt, die zu neutralisierten und mit Charge-Tag versehenen Produkten führt, die sich besonders leicht durch MALDI ionisieren lassen.

Die chemischen und enzymatischen Reaktionen, die in Schritt 4 vorzugsweise zum Einsatz kommen, sind die Entfernung der Primer oder wesentlicher Teile der Primer von den Kettenprodukten nach der Polymerasereaktion, beispielsweise durch eine 5'-Phosphodiesterase oder durch die Aktivierung einer im Primer integrierten chemischen Schnittfunktion. Da der Neuinformationsgehalt des Primers gleich null ist und er lediglich in der massenspektrometrischen Analyse stört, ist es sinnvoll, diesen so zu eliminieren.

In Schritt 4 werden nun gegebenenfalls die Kettenprodukte durch eine Alkylierungsreaktion neutralisiert, wenn beispielsweise  $\alpha$ -S-Nukleoside für die Kopierreaktion eingesetzt wurden.

Die in Schritt 5 vorgenommene massenspektrometrische Messung der Massen der DNA-Kettenprodukte durch

MALDI-Ionisierung in einem geeigneten Massenspektrometer, beispielsweise einem Flugzeitmassenspektrometer, entspricht unter diesen Maßnahmen der Probenvorbereitung dem Stand der heutigen Technik. Auch die Zuordnung der Masse (des Molekulargewichts) zu der Art der Mutation oder zum Wildtyp entspricht dem Stand der Technik.

Ein sehr wesentlicher Punkt ist der Einsatz von Charge-Tags, welche wesentlich zur Steigerung der Detektierbarkeit der Produkte beitragen. Hier bieten sich mehrere Varianten an:

- 1) Integration eines positiven Charge-Tags in den Primer (z. B. via ein T\*).
- 2) Integration eines negativen "charge tags" in den Primer (z. B. über eine unmodifizierte Phosphatbrücke).
- 3) Einführen eines positiven Charge-Tags durch den Terminator (z. B. durch ein  $\alpha$ -S-3'CT-dideoxy-Nukleotid).
- 10 4) Einführen eines negativen Charge-Tags durch einen unmodifizierten dideoxy-Nukleotidbaustein, welcher nicht alkyliert werden kann.

Der Einsatz von Charge-Tags ist natürlicherweise nur sinnvoll im Zusammenhang mit der Entfernung von allen Restladungen aus den DNA-Produkten, da nur in diesem Fall ein vollständig definierter Ladungszustand des Analytmoleküls erreicht wird. Durch dieses Charge-Tagging und durch eine Ladungsneutralisierung der Rest-DNA wird erreicht, daß die Empfindlichkeit 100-mal verbessert wird, und Matrices verwendet werden können, welche selektiv die Desorption von diesen Modifikationen unterstützen, so daß die massenspektrometrische Analyse ohne Aufreinigung möglich wird.

DNA hat ein polyanionisches Rückgrat. Durch das Ersetzen von Phosphat-Brücken im DNA-Rückgrat durch Phosphorothioat-Brücken erhält man eine chemische Funktion, in welcher durch einfache Chemie die negative Ladung entfernt werden kann. Eine Alternative ist, von vornherein modifizierte Nukleotide zu verwenden, die nach ihrer Polymerisation zu Ladungsneutralität am DNA-Rückgrat führen.  $\alpha$ -Methyl-triphosphat-Nukleotide sind z. B. solche Bausteine. Die Neutralisierung der DNA trägt dabei nicht nur zur Erhöhung der Ionisierungsausbeute bei, sondern unterdrückt auch die Bildung von Addukten und trägt zur Stabilisierung der DNA im MALDI-Prozeß bei.

Das Potential dieser Methode liegt einerseits in einer Steigerung der Empfindlichkeit und Verminderung der Adduktbildung durch die implementierten Modifikationen, andererseits können in der MALDI Massenspektrometrie selektiv bestimmte Substanzklassen bevorteiligt werden, wodurch unerwünschte Reaktionsnebenprodukte ausgeblendet werden können.

In der Praxis heißt dies, daß durch die eingeführten Modifikationen und die Wahl der massenspektrometrischen Parameter die relevanten Produkte exklusiv analysiert werden können. Die Templat-DNA kann beispielsweise vollständig ausgeblendet werden und muß daher nicht in einer Aufreinigung entfernt werden. Dies erhöht auch die Möglichkeit der Multiplexierbarkeit. Das gesamte Verfahren kommt mit keiner oder sehr wenig Aufreinigung nach den enzymatischen und chemischen Reaktionsschritten aus.

Die wesentlichen Varianten des Verfahrens sind in den Fig. 5 und 6 zusammengefaßt. Prinzipiell läßt sich jede Variante der Nukleotide mit jeder Variante des Primers kombinieren (Kettenverlängerungsnukleotide haben  $X = OH$ , ein Terminatornukleotid ist dadurch ausgezeichnet, daß  $X \neq OH$  ist).

Jedoch gibt es Kombinationen, die wenig sinnvoll sind. Nützliche Varianten tragen das Charge-Tag (in Fig. 5 und 6 mit "CT" abgekürzt) entweder am Primer oder am Terminator. Sinnvolle Varianten, die das Charge-Tag mit dem Terminator eingefügt bekommen, werden in Kombination mit Primern ohne Charge-Tag verwendet. Ein Charge-Tag am Terminator fügt der Produktkette eine Ladung bei mit  $X = CT^+$ ,  $CT^-$ ,  $Y = OH$  oder  $O^-$ . In einer Variante, in der Kettenverlängerungsnukleotide ohne eine anschließende chemische Modifikation ladungsneutralisiert sind ( $Y = CH_3$ ,  $CH_2F$ ,  $CHF_2$  oder  $CF_3$ ), kann die Ladung im Terminatorkleotid auch mit  $X$  oder  $Y = SH$ ,  $S^-$ ,  $SeH$  oder  $Se^-$  eingeführt werden.

Als Kettenverlängerungsnukleotide werden nur Modifikationen verwendet, die ladungsneutrale oder neutralisierbare Verbrückungsgruppen  $Y$  enthalten, das heißt,  $Y$  sollte selbst ladungsneutral sein ( $Y = H$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2F$ ,  $CHF_2$ ,  $CF_3$ , Alkyl) oder quantitativ neutralisiert werden können ( $Y = SH$ ,  $S^-$ ,  $SeH$ ,  $Se^-$ ). Primer 1 bis 3 kommen zum Einsatz in Systemen, in denen alle Kettenverlängerungsnukleotide und Terminatoren neutralisierbare oder neutrale Verbrückungsgruppen tragen.  $B$  muß definiert komplementär zu einer Base eingebaut werden.

Eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber herkömmlicher DNA kann auch in geringerem Maße erreicht werden, wenn kein Charge-Tag verwendet wird und nur das Rückgrat des Analyten vollständig neutralisiert ist. In diesem Fall muß jedoch eine MALDI Matrix verwendet werden, die in der Lage ist, den Analyten zu protonieren. In diesem Fall bieten sich  $\alpha$ -Cyanozimtsäure sowie Sinapinsäure als Matrices an, die sich auch bereits für Peptide bewährt haben. Das DNA-spezifische Problem des Polyanions, das mittels Matrix in eine einfach geladene Spezies mit entsprechend geringer Effizienz überführt werden muß, entfällt im wesentlichen auch bei alleiniger Neutralisation des Rückgrats. Der Vorteil der Variante ist, daß mehrere bereits an anderen Substanzklassen bewährte MALDI-Matrices zur Verfügung stehen.

Unmodifizierte Oligonukleotide oder DNA selbst eignen sich nicht gut, da deren Detektierbarkeit mittels z. B. MALDI oder ESI Massenspektrometrie eingeschränkt ist. Ein weiterer Vorteil unserer Erfindung ist, daß durch die exklusive Einführung von chemischen Modifikationen in die neu generierten DNA Fragmente eine preferentielle Extrahierbarkeit in der massenspektrometrischen Analyse erreicht wird. Dafür bieten sich Modifikationen wie alkylierte Phosphorothioat DNA oder Methylphosphonate gekoppelt mit Charge-Tags an. Die Detektierbarkeit dieser modifizierten DNA mittels Massenspektrometrie ist 100-mal besser als die der unmodifizierten Sequenzen.

Ein Beispiel einer typischen Mutationsanalyse ist in den obigen Schemata 1 und 2 wiedergegeben. Dieses Analysenverfahren benutzt einen Primer, der sich chemisch oder enzymatisch nach der Polymerasereaktion abspalten läßt, und einen Satz von  $\alpha$ -S-dNTPs (beispielsweise für die Basen C, G und A) und ein ddNTP (in unserem Beispiel für die Base T). Mittels einer Polymerase wird ein Kettenverlängerung an einem Templat mit einer möglichen Punktmutation gemacht, die in diesem Beispiel für den mutierten Typ eine Verlängerung um 9 Basen, und für den Wildtyp ohne Mutation eine Verlängerung um 6 Basen ergibt. Danach wird der vom Primer stammende Teil des Produkts enzymatisch oder chemisch entfernt und das Produkt alkyliert. Alle Thioat-Brücken lassen sich alkylieren, außer der durch den Terminator eingeführten normalen Phosphatbrücke. Diese Ladung fungiert als negatives Charge-Tag. Im negativen Ionenmodus lassen sich jetzt mit hoher Ausbeute und daher praktisch exklusiv die Produkte mit einer Termination nachweisen (also als 10-mer

oder 7-mer). Anhand der Masse sind diese einfach zu unterscheiden und eine direkte Aussage über das Vorhandensein einer Punktmutation wird ermöglicht. Dazu kommt, daß durch die Steigerung der Empfindlichkeit auf Grund der beschriebenen Modifikationen wesentlich weniger Material aufbereitet werden muß und die Messung der modifizierten Produkte auch wesentlich unempfindlicher ist gegen Verunreinigungen aus den Aufbewahrungspuffern der Polymerase und den PCR-Puffern. Wir können daher ohne Aufreinigung arbeiten und die Polymerasereaktion, die Abspaltung des Primers und die Alkylierung hintereinander durchführen, und schließlich in der MALDI-Analyse verwertbare Signale detektieren. 5

Eine Variante wäre die Verwendung eines Terminators, in den man die quaternäre Aminofunktion hineinsynthetisiert hat. Diese Komponente muß in der  $\alpha$ -S-Variante aufbereitet werden. Die Synthese dieser Komponente haben wir bereits durchgeführt und etabliert. Dadurch könnte anschließend entsprechend im positiven Ionenmodus analysiert werden. 10

Durch entsprechendes Design der Primer, der Schnittfunktionen, und unterschiedlicher Distanzen zu den Punktmutationspositionen, die jedem Fachmann auf diesem Gebiet geläufig sind, können auch mehrere Punktmutationssysteme simultan ("multiplex") analysiert werden. Diese können sogar an beiden DNA-Strängen des DNA-Doppelstrangs, d. h. in entgegengesetzter Orientierung, analysiert werden.

Nicht nur die Analyse eines einzelnen PCR-Produkts kann in multipler Weise durchgeführt werden. Eine Multiplex-Analyse kann auch mit einem Satz von mehreren PCR-Produkten gleichzeitig durchgeführt werden, die in einem einzigen Multiplex-PCR-Verfahren vervielfältigt wurden. Verschiedene Teile eines Genoms werden dabei simultan in einer multiplexierten PCR amplifiziert. Anschließend kann an jedem PCR-Produkt mit der notwendigen Anzahl Primer die Analyse durchgeführt werden. Wesentlich ist hierbei, daß alle Einzelanalysen mit der gleichen Kombination von Nukleotiden durchgeführt werden müssen, bei Entwurf und Ausarbeitung der Multiplexanalysen ist daher hierauf Rücksicht zu nehmen. Prinzipiell kann mit einer Kombination von maximal vier Nukleotidsystemen jede erwünschte Information über die Mutationen in einer genomischen DNA abgetastet werden. 15 20

Auch der Einsatz von allen vier  $\alpha$ -S-dNTPs und einem ddNTP, wodurch eine Sequenzleiter erzeugt würde, ist möglich. Auch läßt sich beispielsweise ein positiver CT-Terminator einer Base und ein negativer CT-Terminator einer zweiten Base in einer Sequenzreaktion mischen. 25

Anschließend läßt sich im positiven Ionenmodus die Beendigung durch die eine Base, im negativen Ionenmodus die Beendigung durch die andere Base analysieren.

Die Detektionsempfindlichkeit im MALDI Massenspektrometer fällt mit zunehmender Masse des Analyten deutlich ab. Daher ist es sinnvoll, Sequenzen ohne informativen Gehalt vor der MALDI-Analyse zu entfernen. Das gilt vor allem für die eingesetzten Primer der Kopierreaktion, deren Sequenz zwangsläufig bereits bekannt sein muß und die demnach keine Neuinformation enthalten. 30

Dafür haben wir zwei Verfahren entwickelt. Zum einen kann die Spaltung an einer Thioatbrücke vorgenommen werden, indem eine Alkylierung mit einem Hydroxyalkyliodid durchgeführt wird. Anschließend kann das Rückgrat an dieser Position selektiv alkalisch gespalten werden (mehrere Hydroxyalkyliodide wurden für diesen Zweck getestet).

Eine weitere Möglichkeit ist der enzymatische Verdau des nicht modifizierten Primers vom 5'-Ende her. Mit 5'-Phosphodiesterase wird ein Teil des Primers bis hin zu einer Phosphorothioatfunktion nahe dem 3'-Ende des Primers verdaut. Der Abbruch der Exonuklease durch die Phosphorothioat ergibt eine einheitliche Funktionalisierung des neuen 5'-Endes. Entsprechend funktioniert der Exonukleaseverdau auch wenn sich eine "charge tag" Funktion auf der 3'-Seite der Stopfunktion befindet. 35

Im Anschluß an den Verdau der nicht mit Thioaten verbrückten Abschnitte der Produkt-DNA wird die Pufferlösung lyophilisiert und anschließend werden die Thioatbrücken alkyliert. Das Lyophilisat wird dafür in 10  $\mu$ l bidestilliertem Wasser aufgenommen und mit 37.5  $\mu$ l Acetonitril, 10  $\mu$ l 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer und 15  $\mu$ l Iodmethan vermischt. Das 2-Phasen-Gemisch wird je nach Länge der zu analysierenden DNA 30–40 min. bei 41°C inkubiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 150–600  $\mu$ l 40%igem Acetonitril aufgenommen. Anschließend werden von dieser Lösung 0.2  $\mu$ l auf das zuvor mit alpha-Cyanozimtsäuremethylester (beziehungsweise  $\alpha$ -Cyanozimtsäure für Analyte ohne Charge-Tag) als Matrix beschichtete MALDI-Target aufgetragen und die Probe analysiert. 40 45

Das Alkylierungsverfahren eignet sich gleichermaßen für alle beschriebenen Varianten mit bereits im Analyten vorgeformierten positiven oder negativen fixen Ladungsträgern sowie für Varianten, in denen das Anbinden eines Charge-Tags nicht beabsichtigt ist.

Soll nach dem Verdau der nicht mit Thioaten verbrückten Teile des Analyten jedoch zugleich ein Charge-Tag nachträglich eingebaut und die Neutralisation des DNA-Polyanions erzielt werden, so bieten sich folgende weitere Varianten an: 50

30  $\mu$ l Edukt in TE Puffer werden mit 150  $\mu$ l Acetonitril, 60  $\mu$ l 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,5), 60  $\mu$ l einer 1%igen Lösung von 6-Trimethylammoniumhexansäure N-hydroxysuccinimidylester in Wasser und 60  $\mu$ l Iodmethan in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß vermischt und das 2-Phasen-Gemisch ohne Schütteln 45 min bei 37°C erwärmt. Das Gemisch wird lyophilisiert und in 40%igem Acetonitril für die MALDI-Analyse aufgenommen. Der Ansatz ist optimiert auf simultanes Charge-Tagging und Alkylieren von größeren Substanzmengen. Eine primäre Aminofunktion im Edukt ist Voraussetzung. Sie wird in der Regel durch einen modifizierten Primer eingebracht. 55

Alternativ kann eine Stammlösung des Charge-Tag-Reagenzes durch Lösen von 2 mg (4-Iodbutyl)-triethylammoniumiodid in 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (10  $\mu$ l) hergestellt werden. Je nach Länge des zu alkylierenden Oligos werden verschiedene Mengen dieser Stammlösung für folgendes Alkylierungsprotokoll eingesetzt: 2  $\mu$ l der Eduktlösung in Wasser (ca. 500 pmol/ $\mu$ l), 15  $\mu$ l DMF, 1  $\mu$ l Iodethan, und 9/n  $\mu$ l der Charge-Tag-Stammlösung zuzüglich 2–9/n  $\mu$ l 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (n = Anzahl der Basen der zu alkylierenden Thioat-DNA) werden bei 55°C 30 min inkubiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert. Die Analyse im MALDI-Massenspektrometer ergibt, daß sich unter diesen Bedingungen etwa 30% des gewünschten, mit einer einfach positiven fixen Ladung versehenen Produktes bilden. Diese können durch Verwendung einer nicht aciden Matrix wie alpha-Cyanozimtsäuremethylester auch selektiv detektiert werden. 60 65

Ein Rezept für die Synthese (4-Iodbutyl)-triethylammoniumiodid als Rückgrat Charge-Tag-Reagens sei hier angege-

- ben: Eine Lösung von 1 ml (5mmol) 1,4-Diiodbutan in 5 ml Nitromethan wird bei Raumtemperatur tropfenweise mit 0.6 ml (4.5 mmol) Triethylamin versetzt. Die Lösung wird 1 h unter Rückfluß erhitzt, abgekühlt und im Vakuum eingengt. Der ölige Rückstand wird dreimal mit je 2 ml n-Heptan gewaschen. Bei Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird ein gelber Feststoff erhalten, der erst mit n-Heptan und dann mit Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet wird.
- Rezept zur Herstellung eines Primers mit einer Ladung an einer Thyminbase: Der kommerziell synthetisierte Primer mit einer freien primären Aminofunktion an einer Thyminbase wird in TE-Puffer gelöst und eine Konzentration von ca. 500 pmol/µl eingestellt. 30 µl dieser Lösung werden mit 1.5 µl einer 2M Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung (pH = 7.5) und bei 0°C mit 24 µl einer frisch zubereiteten 1%igen Lösung von 6-Trimethylammoniumhexansäure N-hydroxy-succinimidylester in bidestilliertem Wasser versetzt. Nach 30 min. bei 0°C wird die Lösung im Vakuum zur Trocknung eingengt. Der Rückstand wird in 15 µl 300 mM Ammoniumacetatlösung aufgenommen und die DNA durch Zugabe von 60 µl Ethanol ausgefällt. Die Fällung wird durch Stehenlassen bei -20°C für 2 h vervollständigt und der Niederschlag anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet zweimal mit je 50 µl 80%igem Ethanol nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.
- Rezept zur Synthese eines mit einem Charge-Tag versehenen Terminators: 3'-Amino-3'-desoxythymidin (50 mg, 207 µmol) werden in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 50 µl 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer versetzt. Dann werden 60 mg (210 µmol) 6-Trimethylammonium-hexansäure-(N-hydroxy)-succinimidylester bei 0°C in fester Form unter schnellem Rühren zugegeben. Anschließend wird noch weitere 60 min bei 0°C gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Dichlormethan gewaschen und in Wasser aufgenommen. Beim Lyophilisieren wird ein weißer Schaum erhalten. Das rohe Charge-Tag-Nucleosid wird nach einem literaturbekannten Verfahren (Ludwig, J. and Eckstein, F. "Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorine-4-one". J. Org. Chem. 54, 631-635, 1989) in das entsprechende 5'-α-S-Triphosphat überführt und erst auf dieser Stufe durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 gereinigt.
- Ein praktisches Beispiel der Mutationsanalyse am M13-System ist in den Spektren der Fig. 1 bis 3 gezeigt. Das Schema der Probenvorbereitung sieht wie folgt aus (Abkürzungen: s = Phosphorothioat, a = alkylierte Phosphorothioatbrücke, T<sup>ct</sup> = T, an der Nukleobase kovalent verknüpfte positive Fixladung):
- Templat Wildtyp:  
5'-CAG GCA TGC AAG CTT GGC ACT GGC CGT CGT TTT ACA ACG T-3'
- Templat Mutante:  
5'-CAG GCA TGC AAG TTT GGC ACT GGC CGT CGT TTT ACA ACG T-3'
- Primer: 5'-TA AAA CGA CGG CCA GsT<sup>ct</sup>sG-3'.
- In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dATP-αS, dCTP-αS, dTTP-αS.
- Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-GaT<sup>ct</sup>taGaCaCaAaA-3', m/z [M<sup>+</sup>] = 2594.
- Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-GaT<sup>ct</sup>taGaCaCaAaAaCaTaT-3', m/z [M<sup>+</sup>] = 3924.
- Die Spektren in den Fig. 1-3 zeigen den homozygot vorliegenden Wildtyp, eine homozygot vorliegende Mutante und eine homozygot vorliegende Variante der Mutante.

#### Weitere Anwendungsbeispiele

##### (1) Verwendung eines Thioat-Terminators mit positivem Charge-Tag

- Basensequenz des Wildtyps:  
5'-TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC-3.
- Basensequenz der Mutante:  
5'-TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGT CCC ATC-3'.
- In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dGTP-αS, dATP-αS, dCTP-αS, ddT<sup>ct</sup>TP-αS.
- Primer: 5'-C TGC ATG GGC GGC ATG AAC CG-3', Rückgrat normale Phosphate.
- Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-GaAaGaGaCaCaCaAaT<sup>ct</sup>, m/z = 3116.
- Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-GaAaGaT<sup>ct</sup>, m/z = 1457

##### (2) Verwendung eines unmodifizierten Didesoxyterminators (negatives Charge-Tag)

- Basensequenz des Wildtyps:  
5'-AGC TAC TGA TGC TGT GCA GAT ACT T-3'.
- Basensequenz der Mutante:  
5'-AGC TAC TGA TGC TGT GCA GAC ACT T-3'.
- In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dGTP-αS, dATP-αS, dCTP-αS, ddTTP.
- Primer: 5'-AGC TAC TGA TGC TGT GC-3', Rückgrat normale Phosphate.
- Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-AaGaApT-3', m/z [M<sup>-</sup>] = 1240.
- Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung:  
5'-AaGaAaCaAaCpT-3', m/z [M<sup>-</sup>] = 2221



(3) Verwendung eines Primers mit positivem Charge-Tag und Phosphorothioat-modifiziertem Didesoxyterminator	
Basensequenz des Wildtyps: 5'-GAAAATGTrTTAATTGGTGAC GGAGC-3'.	
Basensequenz der Mutante: 5'-GAA AAT GTr TTA ATT GGT GAC AGA GC-3'.	5
In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: ddGTP- $\alpha$ S, dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dTTP- $\alpha$ S.	
Primer: 5'-GAA AAT GTT TTA ATT GGT <sup>ct</sup> sG-3'.	
Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-T <sup>ct</sup> aGaAaCaG-3', m/z [M <sup>+</sup> ] = 1916.	10
Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-T <sup>ct</sup> aGaAaCaAaG-3'/m/z [M <sup>+</sup> ] = 2259	
(4) Verwendung eines Primers mit positivem Charge-Tag ohne Terminator (Weglassen eines Nucleotids)	15
Basensequenz des Wildtyps: 5'-GAA AAT GTr TTA ATT GGT GAC GGA GC-3'.	
Basensequenz der Mutante: 5'-GAA AAT GTT TTA ATT GGT GAC AGA GC-3'.	
In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dTTP- $\alpha$ S.	20
Primer: 5'-GAA AAT GTT TTA ATT GGT <sup>ct</sup> sG-3'.	
Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-T <sup>ct</sup> aGaAaC-3', m/z [M <sup>+</sup> ] = 1573.	
Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-T <sup>ct</sup> aGaAaCaA-3', m/z [M <sup>+</sup> ] = 1916	25
(5) Verwendung eines Primers mit negativem Charge-Tag und Phosphorothioat-modifiziertem Didesoxyterminator	
Basensequenz des Wildtyps: 5'-GGA ACA GCT TTG AGG TGC GTG TTT GTG-3'.	30
Basensequenz der Mutante: 5'-GGA ACA GCT TTG AGG TGC ATG TTT GTG-3'.	
In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: ddGTP- $\alpha$ S, dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dTTP- $\alpha$ S.	
Primer: 5'-GGA ACA GCT TTG AGG sTG-3'.	
Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaTpGaCaG-3', m/z [M <sup>-</sup> ] = 1591.	35
Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaTpGaCaAaTaG-3', m/z [MS <sup>-</sup> ] = 2268	
(6) Verwendung eines Primers mit negativem Charge-Tag ohne Terminator (Weglassen eines Nucleotids)	40
Basensequenz des Wildtyps: 5'-GGA ACA GCT TTG AGG TGC GTG TTT GTG-3'.	
Basensequenz der Mutante: 5'-GGA ACA GCT TTG AGG TGC ATG TTT GTG-3'.	
In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dTTP- $\alpha$ S.	45
Primer: 5'-GGA ACA GCT TrG AGG sTG-3'.	
Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaTpGaC-3', m/z [M <sup>-</sup> ] = 1248.	
Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaTpGaCaAaT-3', m/z [M <sup>-</sup> ] = 1925	50
(7) Variante ohne Charge-Tagging unter Verwendung eines Phosphorothioat-Terminators	
Basensequenz des Wildtyps: 5'-GCT GAC ATr GAA ATA TGG CGC CAA GCA TGT-3'.	55
Basensequenz der Mutante: 5'-GCT GAC ATT GAA ATA TGG CGT CAA GCA TGT-3'.	
In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: ddTTP- $\alpha$ S, dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dGTP- $\alpha$ S.	
Primer: 5'-GCT GAC ATT GAA ATA TG-3', am Rückgrat normale Phosphate.	
Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaCaGaCaCaAaAaGaCaAaT-3', m/z [M <sup>+</sup> ] = 3609.	60
Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung: 5'-GaCaGaT-3', m/z [M <sup>+</sup> ] = 1264	
(8) Beispiel einer Variante ohne Charge-Tagging und ohne Terminator (Weglassen eines Nucleotids)	65
Basensequenz des Wildtyps: 5'-ATT GAA ATA TGG CGC CAA GCA TGT GAT-3'.	

Basensequenz der Mutante:

5'-ATT GAA ATA TGG CGT CAA GCA in GAT-3'.

In der Kopierreaktion werden als Nukleotide eingesetzt: dATP- $\alpha$ S, dCTP- $\alpha$ S, dTTP- $\alpha$ S.

Primer: 5'-ATr GAA ATA TGG CGT CAA G-3'.

- 5 Produkt bei Vorliegen des Wildtyps nach Nukleaseverdau und Alkylierung:

5'-CaAaT-3', m/z [M<sup>+</sup>] = 905.

Produkt bei Vorliegen der Mutante nach Nukleaseverdau und Alkylierung:

5'-CaAaTaTaT-3', m/z [M<sup>+</sup>] = 1573

10

#### Patentansprüche

15

1. Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse bekannter Mutationen durch Basenaustausch ("Punktmutationen"), Basendreher, Baseneinschub ("Insertion") oder Basenverlust ("Deletion") in genomischer DNA, durch folgende Schritte gekennzeichnet:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- 1) PCR-Vervielfältigung einer DNA-Sequenz, die durch ihre selektierenden Primer die Mutation umfaßt,
  - 2) Zugabe eines besonderen Satzes von modifizierten Nukleosidtriphosphaten für eine kopierende, beschränkte Primerverlängerung der bereits vorhandenen oder neu zugegebener Primer, wobei
    - (a) der besondere Satz von Nukleosidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Kettenverlängerung durch die Kopierreaktion beim nächsten Auftreten einer durch die Zusammensetzung des Satzes bestimmten Base im zu kopierenden DNA-Gegenstrang endet,
    - (b) der besondere Satz von Nukleosidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Primerverlängerung bis zur Stelle der Mutation oder darüber hinaus läuft, so daß die Produktkette im Wildtyp ein anderes Molekulargewicht hat als im Mutanten, und
    - (c) die Modifizierung der Nukleosidtriphosphate entweder allein oder in Verbindung mit einer nachträglichen chemischen Behandlung (in Schritt 4) zu einer Stabilisierung der DNA-Kette im Ionisierungsprozeß, zu einer Adduktminderung der Ionen, zu einer Erhöhung der Ionisierungsausbeute und/oder zu einer Veränderung der Masse der DNA-Kette führt,
  - 3) die durch Schritt 2 vorbereitete, beschränkte Primerverlängerung mit Hilfe eines Enzyms, die den DNA-Gegenstrang komplementär kopiert,
  - 4) ein Abbau von zumindest einem Teilstück der Primer und gegebenenfalls eine weitere chemische Modifizierung der Produktketten, und
  - 5) massenspektrometrische Bestimmung der Masse der modifizierten Ketten und Zuordnung der detektierten Massen zu Wildtyp oder Mutante.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im besonderen Satz der Nukleotidtriphosphate aus Schritt 2 die zu einer oder zwei Basen gehörenden Nukleotidtriphosphate fehlen, so daß hierdurch die Beendigung der Kettenverlängerung eintritt
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im besonderen Satz der Nukleotidtriphosphate aus Schritt 2 die zu einer oder zwei Basen gehörenden Nukleotidtriphosphate so modifiziert sind, daß sie die Kettenverlängerung terminieren, so daß hierdurch die Beendigung der Kettenverlängerung eintritt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein modifiziertes Didesoxynukleosidtriphosphat als terminierendes Nukleosidtriphosphat eingesetzt wird.
5. Vergrößerung der Massenverschiebung.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der besondere Satz von modifizierten Nukleosidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die nachfolgende Kettenverlängerung der Primer im Wildtyp bei einer anderen Zahl von Basen aufhört als beim Mutanten.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der besondere Satz von modifizierten Nukleotidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die nachfolgende Kettenverlängerung über die Stelle der Mutation hinausläuft, die Mutation aber wegen eines Basenaustauschs, einer Basenveränderung, eines Baseneinschubs oder eines Basenverlustes am veränderten Molekulargewicht gegenüber dem Wildtyp kenntlich ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß während der PCR-Amplifikation der DNA-Sequenz in Schritt 1 die Nukleotidtriphosphate aufgebraucht werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach der PCR-Amplifikation der DNA-Sequenz in Schritt 1 die Restnukleotidtriphosphate der Amplifikation entfernt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das PCR-Produkt mit einem DNA-Aufreinigungsverfahren (z. B. Ethanolfällung, Phenolextraktion, Spin-Column-Aufreinigung) von den Restnukleotidtriphosphaten der PCR befreit wird.
11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Restnukleotidtriphosphate der PCR mittels einer Phosphatase zerstört werden.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die im Schritt 2 eingesetzten Nukleotidtriphosphate so modifiziert sind, daß durch die Kettenverlängerung des Primers und einer etwaigen zusätzlichen chemischen Neutralisierung dem Produkt keine weitere Ladung zugeführt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die im Schritt 2 eingesetzten Nukleotidtriphosphate so modifiziert sind, daß durch die Kettenverlängerung des Primers und einer etwaigen zusätzlichen chemischen Neutralisierung dem Produkt nur eine einzige Ladung zugeführt wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vor, während oder nach Schritt 2 neue Primer zugegeben werden, die nahe bei den zu untersuchenden Positionen der Mutationen hybridisieren.
15. Verfahren nach Anspruch 13. dadurch gekennzeichnet, daß die neu zugesetzten Primer eine Modifikation tra-

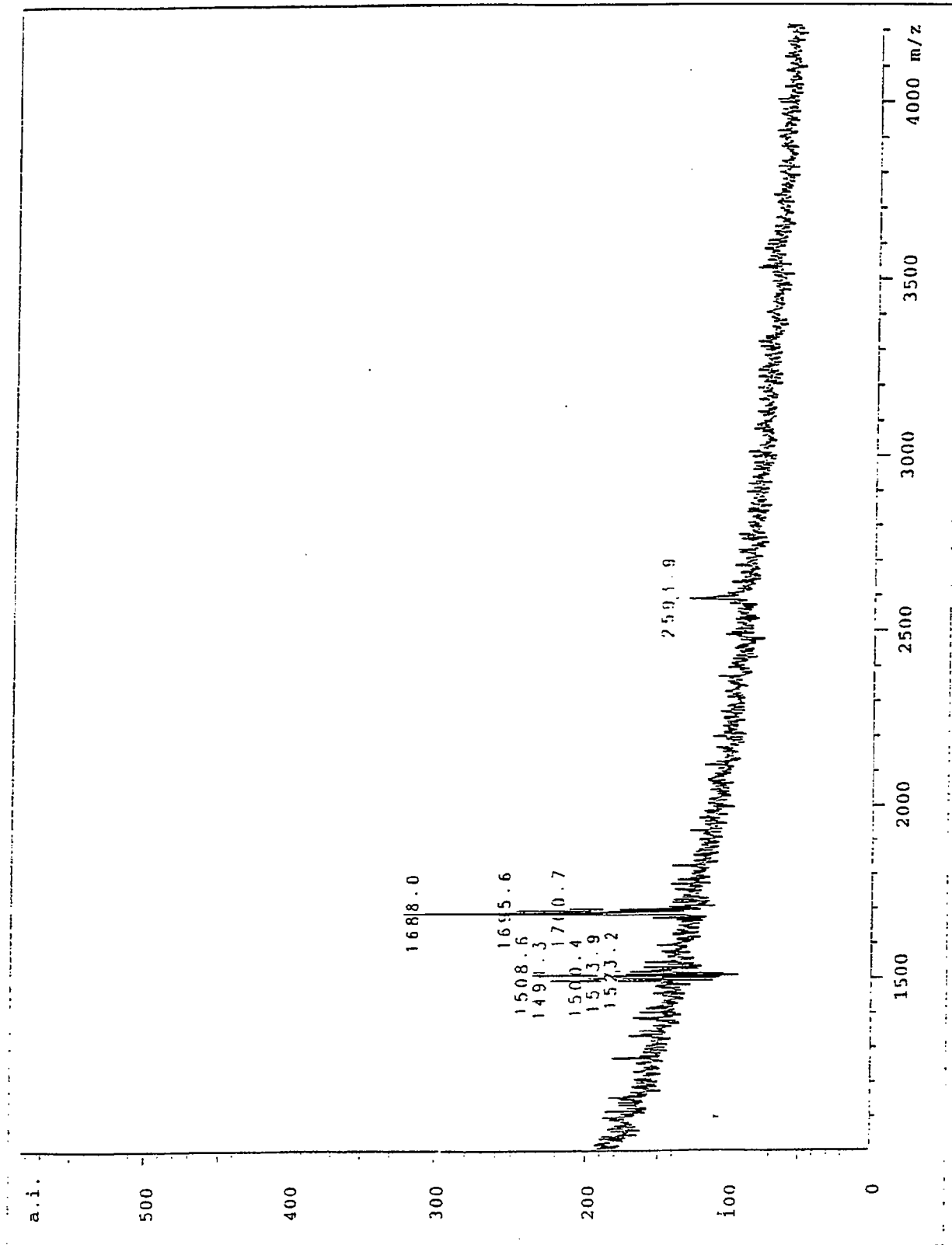
- gen, die zum Anbringen einer fixen Ladung ("charge tag") dient oder bereits einen fixen Ladungsträger beinhaltet.
16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die neu eingesetzten Primer eine positive oder negative Fixladung tragen.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die neu eingesetzten Primer eine Modifikation tragen, welche die Entfernung eines Teils dieses Primers im nachfolgenden Schritt 4 ermöglicht.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt 4 die Produktketten um einen Teil des enthaltenen Primers verkürzt werden.
19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die neu eingesetzten Primer durch die Aktivierung einer eingebauten chemischen Funktion teilweise entfernt werden.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die neu eingesetzten Primer gänzlich dem Produkt keine Ladung zuführen.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Kettenverlängerung hervorgegangenen modifizierten Phosphatbrücken im Produkt durch einen 5'-Phosphodiesteraseverdau nicht gebrochen werden können und die Primer durch 5'-Phosphodiesteraseverdau entfernt werden.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt 4 die überschüssigen Ladungen der Produkte chemisch ladungsneutralisiert werden.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Ionisierung zur massenspektrometrischen Massenbestimmung in den Schritten 3 und 4 die matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) angewendet wird.
24. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß für die MALDI-Ionisierung eine Matrix verwendet wird, die praktisch ausschließlich nur in den Schritten 3 und 4 hergestellten Produkte ionisiert (z. B.  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäuremethylester).
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß für die Ionisierung zur massenspektrometrischen Massenbestimmung in Schritt 5 die Elektrosprüh-Ionisierung angewendet wird.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch Anwendung mehrerer Primer gleichzeitig mehrere Produkte durch die Schritte durchgeführt werden, die zu DNA-Ketten verschiedener Längen führen.
27. Vorgefertigter Satz an Chemikalien (Kit) für die Durchführung der Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile für die Schritte 1 bis 4 so zusammengestellt werden, daß bestimmte Mutationen, die zu einem bestimmten Krankheitsbild führen können, gleichzeitig abgefragt werden können.
28. Vorgefertigter Satz an Chemikalien (Kit) für die Durchführung der Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile mindestens zwei spezifische Primer für die erste PCR und die modifizierten Nukleosidtriphosphate für Schritt 2 umfassen.
29. Verfahren zur massenspektrometrischen Identifizierung bekannter Mutationen durch Basenaustausch ("Punktmutation"), chemische Basenveränderung, Basendreher, Baseneinschub ("Insertion") oder Basenverlust ("Deletion") in genomischer DNA, umfassend die Schritte (1) PCR-Amplifikation einer DNA-Sequenz, die die Mutation umfaßt, mit selektierenden Primern, (2) Zugabe eines besonderen Satzes von Nukleotidtriphosphaten für eine kopierende, beschränkte Kettenverlängerung der bereits vorhandenen oder neu zugegebener Primer, wobei (a) der besondere Satz von Nukleotidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Kettenverlängerung durch die Kopierreaktion beim nächsten Auftreten einer durch die Zusammensetzung des Satzes bestimmten Base im zu kopierenden DNA-Gegenstrang endet, (b) der besondere Satz von Nukleotidtriphosphaten so zusammengesetzt ist, daß die Kettenverlängerung der Primer bis zur Stelle der Mutation oder darüber hinaus läuft, so daß die Produktkette im Wildtyp ein anderes Molekulargewicht hat als im Mutanten, (3) die durch Schritt 2 vorbereitete, beschränkte Kettenverlängerung der Primer mit Hilfe einer Polymerase, die den DNA-Gegenstrang komplementär kopiert, (4) gegebenenfalls eine weitere chemische Modifizierung der Kettenprodukte, und (5) massenspektrometrische Bestimmung der Masse der modifizierten Ketten und Zuordnung der detektierten Massen zu Wildtyp oder Mutante, dadurch charakterisiert, daß die in Schritt 2 zugegebenen Nukleotidtriphosphate so modifiziert sind, daß ihr Einbau in die DNA-Kette entweder allein oder in Verbindung mit einer nachträglichen, in Schritt 4 vorgenommenen chemischen Behandlung zu einer Stabilisierung der DNA-Kette im Ionisierungsprozeß, zu einer Minderung der Adduktbildung, zu einer Erhöhung der Ionisierungsausbeute und/oder zu einer Veränderung der Masse der DNA-Kette führt.

---

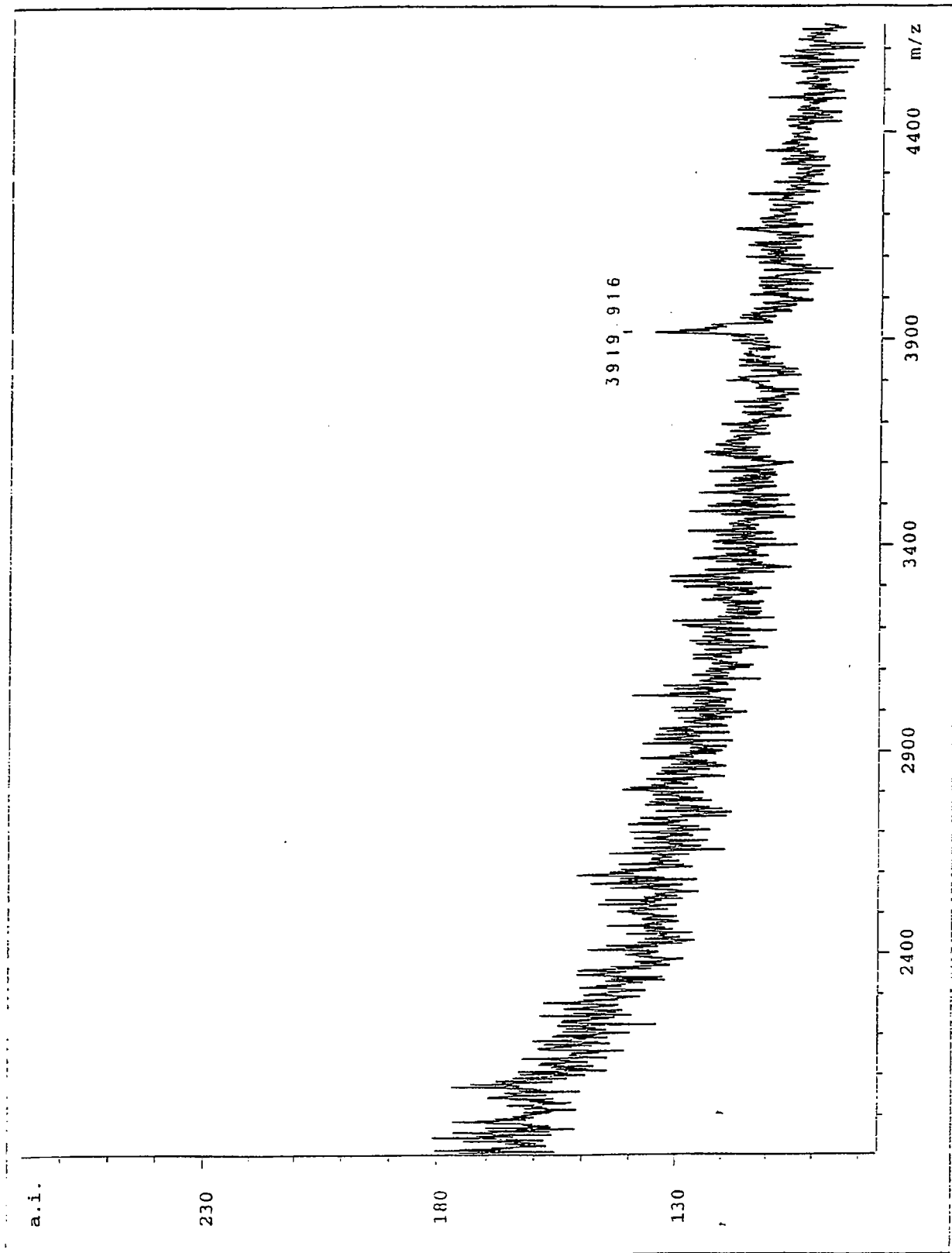
Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

---

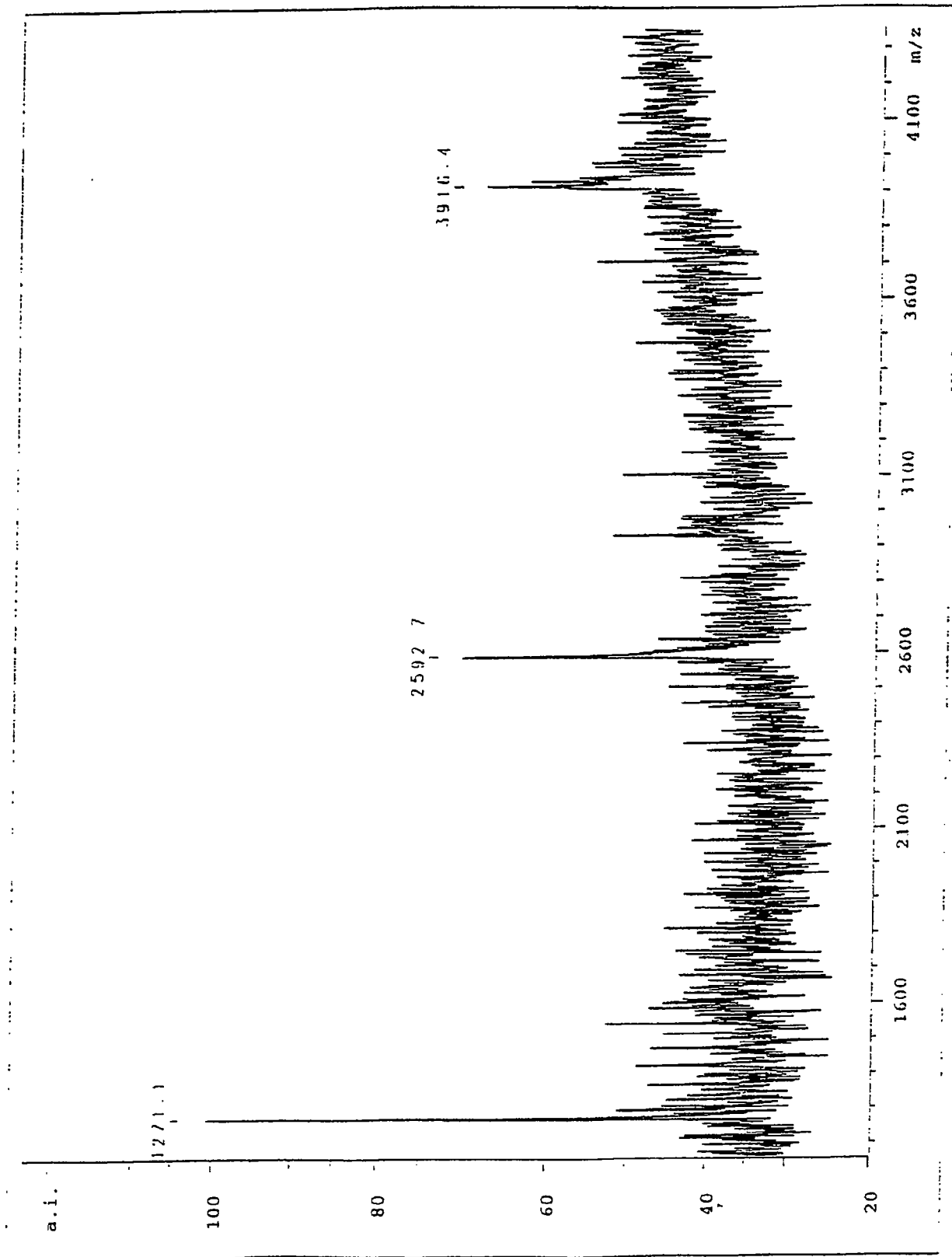
Figur 1



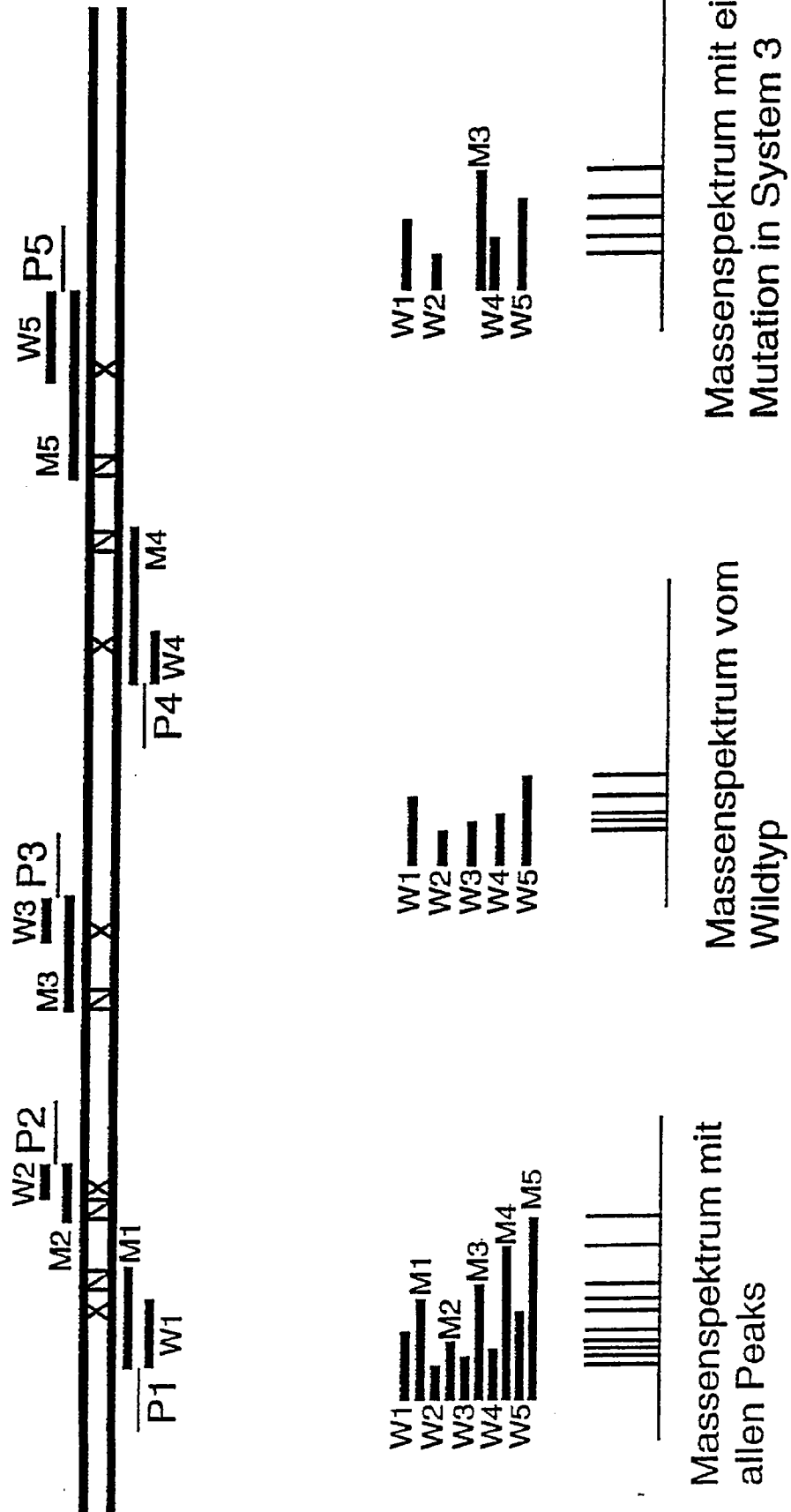
Figur 2

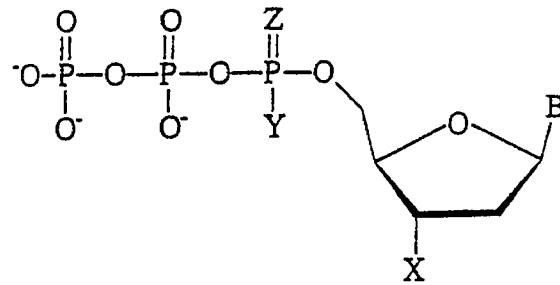


Figur 3

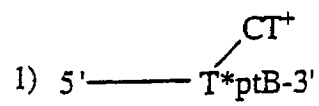


Figur 4





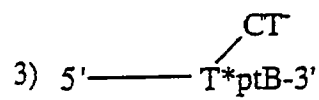
Figur 5



pt = Phosphorothioat



p = Phosphat



Figur 6